

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 octobre 2000 (09.10.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00393	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340559/17921
Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 février 2000 (17.02.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 17 février 1999 (17.02.99)
Déposant RENNO, Toufic etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 septembre 2000 (11.09.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Henrik Nyberg

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 08 mars 2001 (08.03.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340559/17921	
Demande internationale no PCT/FR00/00393	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 février 2000 (17.02.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant ☐ l'inventeur ☒ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 26, avenue Kléber F-75116 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 45 00 92 02	
	no de télécopieur 01 45 00 46 12	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 20, rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 44 29 35 00	
	no de télécopieur 01 44 29 35 99	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Yolaine CUSSAC no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 340559/17921	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00393	International filing date (day/month/year) 17 February 2000 (17.02.00)	Priority date (day/month/year) 17 February 1999 (17.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/00		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 September 2000 (11.09.00)	Date of completion of this report 23 November 2000 (23.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (U.S.)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00393

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-23, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-43, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/4-4/4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/00393

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

1. The sequence listing as originally filed (pages 1 to 4) is among the documents taken into consideration in establishing the present report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00393

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-43	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-43	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-43	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. Reference is made to the following document:**

D1: FR-A-2 748 476 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 14
November 1997 (1997-11-14)

2. The document "Kim S. K. et al., Journal of Immunology, vol. 162, no. 11, pages 6855-66, 1999", which is cited as a "P" document in the international search report, is not part of the prior art under the terms of PCT Article 33(2), since the priority date claimed is valid.

3. Since the special combination of features in claim 1 is not disclosed in the prior art, the subject matter of said claim is considered to be novel (PCT Article 33(2)).

4. Furthermore, the subject matter of claim 1 involves an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

The closest prior art is considered to be document D1.

Document D1 discloses the use of OmpA protein fragments as a carrier protein coupled to an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

oligosaccharide or polysaccharide epitope naturally present in pathogens in order to form immunogenic complexes that transform said epitope into T-dependent immunogens (see page 5, lines 26-34 and page 8, lines 12-15).

The subject matter of claim 1 differs from D1 in that the OmpA protein is used to generate or increase a cytotoxic T cell response.

The technical effect of this difference is an enhanced immune response to infectious agents or tumour cells.

Therefore, the technical problem to be solved appears to be that of preparing a pharmaceutical composition effective against infectious agents or tumour cells.

The technical problem has been solved by showing that protein OmpA has the property of eliciting a cytotoxic T cell response to a molecule optionally covalently associated therewith.

Since no such property is disclosed or suggested in the prior art (PCT Article 33(2)), the subject matter of claim 1 as well as dependent claims 2 to 24 is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

5. Since the special combination of features in claim 25 is not disclosed in the prior art, the subject matter of said claim is considered to be novel (PCT Article 33(2)).

6. Furthermore, the subject matter of said claim 25 involves an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

The closest prior art is considered to be document

THIS PAGE BLANK (USPTO)

D1.

Document D1 describes pharmaceutical compositions including antigen complexes (see page 11, lines 18-23) characterised by an OmpA protein fragment combined with an oligosaccharide or polysaccharide epitope naturally present in pathogens (see page 5, lines 26-34 and page 8, lines 12-15). The epitopes can be prepared from a bacteria or fungus (page 6, lines 1-11).

The subject matter of claim 25 differs from D1 in that the OmpA protein is associated with an antigen or a hapten associated therewith or specific to a tumour cell. The technical effect of this difference is that an antitumour response is stimulated.

Therefore, the technical problem to be solved appears to be that of providing a pharmaceutical composition for treating tumours.

The technical problem has been solved by showing that protein OmpA has the property of eliciting a cytotoxic T cell response to a molecule optionally covalently associated therewith. Therefore, the combination of at least one antigen or a hapten associated therewith or specific to a tumour cell, with an OmpA protein enables the generation of cytotoxic T cells capable of recognising and destroying tumour cells.

Since no such combination is disclosed or suggested in the prior art (PCT Article 33(2)), the subject matter of claim 25 as well as dependent claims 26 to 43 is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

7. There are no uniform criteria in the PCT for determining whether claims 1 to 24 are industrially

THIS PAGE BLANK (US-1)

applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. Therefore, the European Patent Office does not consider the subject matter of use claims relating to the medical use of a compound to be industrially applicable. However, claims relating to a known compound, for a first medical use, will be accepted, as will claims relating to the use of such a compound for producing a drug with a view to a novel medical treatment.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00393

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to the requirement of PCT Rule 5.1(a)(ii), the relevant prior art disclosed in document D1 has not been indicated in the description, nor has this document been cited.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 27 NOV 2000

WIPO



PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340559/17921	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00393	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17/02/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 17/02/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K39/00		
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/09/2000	Date d'achèvement du présent rapport 23.11.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Jacques, P N° de téléphone +49 89 2399 8934 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-23 version initiale

Revendications, N°:

1-43 version initiale

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00393

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n^{os} :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-43
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-43
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-43
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK

Concernant le point I**Base de l'opinion**

1. La liste des séquences telle que déposée à l'origine (page 1 à 4) fait partie des documents pris en considération pour l'établissement de ce rapport.

Concernant le point V**Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Il est fait référence au document suivant:

D1: FR-A-2 748 476 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 14 novembre 1997 (1997-11-14),

2. Le document "Kim S.K. et al., Journal of Immunology, vol. 162, N° 11, pp 6855-66, 1999" cité comme document "P" dans le rapport de recherche international, ne fait pas parti de l'état de la technique au sens de l'Article 33(2) PCT, la date de priorité revendiquée étant valide.
3. La combinaison particulière des caractéristiques de la revendication 1 n'étant pas révélée dans l'art antérieur, l'objet de ladite revendication est considéré comme nouveau au sens de l'Article 33(2) PCT.
4. De plus l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT pour la raison suivante:
L'état de la technique le plus proche est considéré être le document D1.
Ce document D1 révèle l'utilisation de fragments d'une protéine de type OmpA en tant que protéine porteuse couplée à un épitope oligo-ou polysaccharidique naturellement présent dans des agents pathogènes pour former des complexes immunogènes transformant ledit épitope en immunogène T dépendants (voir la page 5, lignes 26 à 34 et la page 8, lignes 12 à 15).
L'objet de la revendication 1 diffère de D1 dans le fait que la protéine OmpA est

THIS PAGE BLANK

utilisée pour générer ou accroître une réponse T cytotoxique.

L'effet technique de cette différence résulte dans l'amélioration de la réponse immunitaire contre des agents infectieux ou des cellules tumorales.

Le problème technique à résoudre apparaît donc comme la préparation d'une composition pharmaceutique efficace contre des agents infectieux et des cellules tumorales.

Le problème technique a été résolu par la mise en évidence que la protéine OmpA a la propriété d'éluciter une réponse T cytotoxique contre une molécule qui lui est associée de manière covalente ou non.

Une telle propriété n'étant pas révélée ni suggérée dans l'art antérieur tel que défini par l'Article 33(2) PCT, l'objet de la revendication 1, ainsi que des revendications dépendantes 2 à 24, est considérée comme impliquant une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

5. La combinaison particulière des caractéristiques de la revendication 25 n'étant pas révélée dans l'art antérieur, l'objet de ladite revendication est considéré comme nouveau au sens de l'Article 33(2) PCT.

6. De plus l'objet de ladite revendication 25 implique une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT pour la raison suivante:

L'état de la technique le plus proche est considéré être le document D1.

Ce document D1 révèle des compositions pharmaceutiques comprenant des complexes antigéniques (voir la page 11, lignes 18 à 23) caractérisés par un fragment d'une protéine de type OmpA associé à un épitope oligo-ou polysaccharidique naturellement présent dans des agents pathogènes (voir la page 5, lignes 26 à 34 et la page 8, lignes 12 à 15). Ces épitopes pouvant être obtenus à partir d'une bactérie ou d'un champignon (page 6, lignes 1 à 11)

L'objet de la revendication 25 diffère de D1 dans le fait que la protéine OmpA est associée à un antigène ou un haptène associé ou spécifique d'une cellule tumorale. L'effet technique de cette différence résulte dans la stimulation d'une réponse antitumorale.

Le problème technique à résoudre apparaît donc comme la mise au point d'une composition pharmaceutique permettant le traitement de tumeurs.

THIS PAGE BLANK

Le problème technique a été résolu par la mise en évidence que la protéine OmpA à la propriété d'éluciter une réponse T cytotoxique contre une molécule qui lui est associée de manière covalente ou non. Ainsi, l'association d'au moins un antigène ou un haptène associé ou spécifique d'une cellule tumorale avec une protéine OmpA va permettre la génération de lymphocytes T cytotoxiques capables de reconnaître et de détruire les cellules tumorales.

Une telle association n'étant pas révélée ni suggérée dans l'art antérieur tel que défini par l'Article 33(2) PCT, l'objet de la revendication 25, ainsi que des revendications dépendantes 26 à 43, est considéré comme impliquant une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

7. Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 1 à 24 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

1. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le document D1 et ne cite pas ce document.

THIS PAGE BLANK (PTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340559/17921	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00393	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17/02/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 17/02/1999

Déposant

PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☐ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Martin Jean-Jacques
CABINET REGIMBEAU
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

[stamp]

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)
23.11.2000

Applicant's or agent's file reference
340559/17921

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/FR00/00393

International filing date (day/month/year)
17/02/2000

Priority date (day/month/year)
17/02/1999

Applicant
PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. + 49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: 49 89 2399 - 4465

Authorized officer:

Digiusto, M

Tel. +49 89 2399-8162



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference 340559/17921	FOR FURTHER ACTION		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR00/00393	International filing date (day/month/year) 17/02/2000	Priority date (day/month/year) 17/02/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/00			
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.			

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	<p>This REPORT consists of a total of 6 sheets including this title page.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of sheets.</p>
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11/09/2000	Date of completion of this report 23.11.2000
<p>Name and mailing address of the IPEA/</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> <p>European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465</p> </div> </div>	<p>Authorized officer:</p> <p>Jacques, P</p> <p>Telephone No. +49 89 2399 8934</p> <div style="text-align: right;"> </div>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00393

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-23 as originally filed

Claims, No.:

1-43 as originally filed

Drawings, sheets:

1/4-4/4 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

THIS PAGE BLANK (USP 10)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/ FR00/00393

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/fig

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).

6. Additional observations, if necessary:
see separate sheet

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes:	Claims	1-43
	No:	Claims	
Inventive Step	Yes:	Claims	1-43
	No:	Claims	
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-43
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:
see separate sheet

THIS PAGE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

With regard to point I

Basis of the opinion

1. The sequence listing as originally filed (page 1 to 4) is part of the documents taken into consideration when establishing this report.

With regard to point V

Reasoned statement pursuant to rule 66.2(a)(ii) regarding the novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following document:

D1: FR-A-2 748 476 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 14 November 1997 (1997-11-4).

2. The document "Kim S.K. et al., Journal of Immunology, vol. 162, No. 11, pp 6855-66, 1999", cited as document "P" in the international search report, is not part of the state of the art within the meaning of Article 33(2) PCT, the priority date claimed being valid.

3. Since the particular combination of the characteristics of claim 1 is not revealed in the prior art, the subject matter of said claim is considered to be novel within the meaning of Article 33(2) PCT.

4. In addition, the subject matter of claim 1 involves an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT for the following reason:

The closest state of the art is considered to be document D1.

This document D1 reveals the use of fragments of an OmpA-type protein, as a carrier protein coupled to an oligosaccharide or polysaccharide epitope which is naturally present in pathogenic agents, in order to form immunogenic complexes which transform said epitope into a T-dependent immunogen (see page 5, lines 26 to 34 and page 8, lines 12 to 15).

The subject matter of claim 1 differs from D1 in that the OmpA protein is used to generate or increase a cytotoxic T response.

The technical effect of this difference results in the improvement of the immune response against infectious agents or tumor cells.

The technical problem to be solved appears, therefore, to be the preparation of a pharmaceutical composition which is effective against infectious agents and tumor cells.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The technical problem has been solved by demonstrating that the OmpA protein has the property of eliciting a cytotoxic T response against a molecule which is covalently or noncovalently associated therewith.

Since such a property is neither revealed nor suggested in the prior art as defined by Article 33(2) PCT, the subject matter of claim 1, and also of the dependent claims 2 to 24, is considered to involve an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT.

5. Since the particular combination of the characteristics of claim 25 is not revealed in the prior art, the subject matter of said claim is considered to be novel within the meaning of Article 33(2) PCT.

6. In addition, the subject matter of said claim 25 involves an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT for the following reason:

The closest state of the art is considered to be document D1.

This document D1 reveals pharmaceutical compositions comprising antigenic complexes (see page 11, lines 18 to 23) characterized by a fragment of an OmpA-type protein, which is combined with an oligosaccharide or polysaccharide epitope which is naturally present in pathogenic agents (see page 5, lines 26 to 34 and page 8, lines 12 to 15), these epitopes possibly being obtained from a bacterium or from a fungus (page 6, lines 1 to 11).

The subject matter of claim 25 differs from D1 in that the OmpA protein is combined with an antigen or a hapten which is associated with or specific for a tumor cell.

The technical effect of this difference results in the stimulation of an antitumor response.

The technical problem to be solved appears, therefore, to be the development of a pharmaceutical composition which makes it possible to treat tumors.

The technical problem has been solved by demonstrating that the OmpA protein has the property of eliciting a cytotoxic T response against a molecule which is covalently or noncovalently associated therewith. Thus, the combination of at least one antigen or one hapten which is associated with or specific for a tumor cell, with an OmpA protein will make it possible to generate cytotoxic T lymphocytes capable of recognizing and of destroying the tumor cells.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Since such a combination is neither revealed nor suggested in the prior art as defined by Article 33(2) PCT, the subject matter of claim 25, and also of the dependent claims 26 to 43, is considered to involve an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT.

7. No unified criterion exists in the PCT member States for determining whether claims 1 to 24 are capable of industrial application. The patentability may also depend on the manner in which the claims have been formulated. Thus, the European patent office does not consider the subject matter of claims of use of a compound for medical purposes to be capable of industrial application. On the other hand, claims relating to a known compound, for a first use for medical purposes, and also claims relating to the use of such a compound in the manufacture of a medicinal product with a view to a novel medical treatment may be accepted.

With regard to point VII

Irregularities in the international application

1. Contrary to that which is required by rule 5.1 a) ii) PCT, the description does not indicate the relevant prior state of the art set out in document D1 and does not cite that document.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 39/00, 48/00, A61P 31/00, 33/00, 35/00, A61K 39/385 // C07K 14/26, C12N 15/62	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/48628 (43) Date de publication internationale: 24 août 2000 (24.08.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00393 (22) Date de dépôt international: 17 février 2000 (17.02.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/01917 17 février 1999 (17.02.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RENNO, Toufic [LB/FR]; Les Coulerins B1, F-74580 Viry (FR). BON- NEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: USE OF AN ENTEROBACTERIUM PROTEIN OMPA ASSOCIATED WITH AN ANTIGEN FOR GENERATING AN ANTIVIRAL, ANTIPARASITIC OR ANTITUMORAL CYTOTOXIC RESPONSE (54) Titre: UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE A UN ANTIGENE POUR GENERER UNE REPONSE CYTOTOXIQUE ANTIVIRALE, ANTIPARASITAIRE OU ANTITUMORALE (57) Abstract <p>The invention concerns the use of an enterobacterium OmpA membrane protein, in particular of <i>Klebsiella pneumoniae</i> associated with an antigen or a hapten for preparing a pharmaceutical composition for generating or enhancing a cytotoxic T response directed against an infectious or tumor cell. The invention also concerns the use of said compounds for preventing and treating infection or cancer, in particular cancers associated with a tumoral antigen such as melanoma, and pharmaceutical compositions comprising some of said compounds.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment de <i>Klebsiella pneumoniae</i>, associée à un antigène ou un haptène pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre un agent infectieux ou une cellule tumorale. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la prévention et le traitement d'infection ou de cancer, notamment les cancers associés à un antigène tumoral tels que le mélanome, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant certains de ces composés.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE A UN ANTIGENE POUR GENERER UNE REPONSE CYTOTOXIQUE ANTIVIRALE, ANTIPARASITAIRE OU ANTITUMORALE.

L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, associée à un antigène ou un haptène pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre un agent infectieux ou une cellule tumorale. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la prévention et le traitement d'infection ou du cancer, notamment les cancers associés à un antigène tumoral tels que les mélanomes, ainsi que des compositions pharmaceutiques comprenant certains de ces composés.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir ou de réduire les infections virales ou bactériennes. Le succès des campagnes de vaccination dans ces domaines a permis d'étendre le concept de vaccin jusqu'alors utilisé dans le domaine de l'infectiologie aux domaines du cancer et des maladies auto-immunes. Les antigènes vaccinaux administrés seuls chez l'hôte ne sont souvent pas assez immunogéniques pour induire une réponse immunitaire, et doivent donc être associés à un adjuvant ou couplés à une protéine porteuse pour induire (ou augmenter) leur immunogénicité. Dans ces conditions, seule une réponse immune de type humorale peut être induite. Or, dans le cadre d'une thérapie antivirale, la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) capables de reconnaître et de détruire le virus est de toute importance (Bachmann et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24, 2228-2236 ; Borrow P., 1997, J. Virol. Hepat., 4, 16-24), comme l'attestent de nombreuses études montrant, *in vivo*, le rôle protecteur des réponses dirigées contre les épitopes viraux (Arvin AM, 1992, J. Inf. Dis., 166, S35-S41 ; Koszinowski et al., 1987 Immunol. Lett., 16, 185-192).

L'importance des réponses CTL a aussi été fortement documentée dans les réponses antitumorales notamment celles dirigées contre les cellules de mélanome (revue dans Rivoltini et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18, 55-63). Le ou les épitopes CTL (séquences peptidiques interagissant avec les molécules de classe I et présentés aux lymphocytes T CD8+) ont été définis pour plusieurs antigènes. Cependant, la

difficulté réside dans la génération de CTL *in vivo*, due à la faible immunogénicité de ces peptides (Melief, 1992, Adv. Cancer Res., 58, 143-175 ; Nandaz et Sercarz, 1995, Cell, 82, 13-17).

Des recherches s'orientent par conséquent vers l'identification de nouveaux adjuvants, ou de système de délivrance d'antigènes («delivery system»), permettant d'induire des CTL. Grâce à leur efficacité à présenter les antigènes et à stimuler le système immunitaire, les cellules dendritiques, par exemple, ont été utilisées pour générer des réponses CTL antivirales (Ludewig B et al., 1998, J. Virol., 72, 3812-3818 ; Brossard P. et al., 1997, J. Immunol., 158, 3270-3276) ou anticancéreuses (Nestle F.O. et al., 1998, Nat. Med., 4, 328-332). Les approches ont consisté à charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec l'antigène d'intérêt (peptides ou lysat cellulaire) et réimplanter ces cellules chez le patient. D'autres approches consistent à transfecter *ex vivo* les cellules dendritiques avec le gène codant pour l'antigène d'intérêt et à réinjecter ces cellules transfectées (Gilboa E. et al., 1998, Cancer Immunol. Immunother., 46, 82-87). Ces approches ont été utilisées avec succès chez la souris et récemment chez l'homme (Hsu F.J. et al., 1996, Nat. Med., 2, 52-58) mais restent néanmoins complexes dans la mesure où ces cellules doivent être traitées *ex vivo* (transformation des cellules ou internalisation des antigènes) et transplantées dans l'organisme hôte. De même, l'utilisation de particules de type viral (Layton G.T. et al., 1993, J. Immunol., 151, 1097-1107) ou de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) (Valmori et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1458-1462) permet de générer des réponses CTL. Toutefois, une vaccination antivirale ou antitumorale réalisée avec des peptides correspondant à des épitopes CTL et en présence d'un tel adjuvant peuvent conduire à un état de tolérance spécifique qui peut conduire dans certains cas à l'effet contraire recherché, c'est-à-dire à une diminution de la réponse immune (Toes et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 7855-7860).

Ainsi, il existe aujourd'hui un grand besoin de disposer d'un composé qui, associé à une molécule, notamment un antigène ou haptène, soit capable de générer des CTL dirigés contre ladite molécule. Un tel composé pourrait en particulier être utilisé pour la préparation d'une composition vaccinale destinée à induire une

protection immunitaire de type CTL antiviral, antibactérien, antifongique ou antiparasitaire, ou antitumoral.

De manière surprenante, il a été mis en évidence qu'une protéine de la membrane externe de bactérie à gram négatif, notamment une protéine OmpA d'entérobactérie telle que la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* (protéine décrite dans WO 95/27787 et WO 96/14415), a la propriété d'éluciter une réponse CTL contre une molécule qui lui est associée de manière covalente ou non, de préférence sans recours à l'addition d'un autre adjuvant.

Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, d'un de ses fragments ou d'une séquence nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou à accroître une réponse T cytotoxique contre un agent infectieux ou une cellule tumorale, *in vitro* ou *in vivo*, de préférence *in vivo*, ainsi que pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou à accroître ladite réponse T cytotoxique.

Dans la présente invention, on entendra désigner par le terme « protéine » également les peptides ou les polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer Membrane Protéin »), les protéines de la membrane externe de type A.

Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine OmpA qui, lorsqu'il est associé à un antigène ou haptène spécifique d'un agent infectieux ou d'une cellule tumorale, est capable de générer ou accroître une réponse T cytotoxique dirigée contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale, ledit fragment de la protéine OmpA comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés ou de manière plus préférée au moins 15 acides aminés.

Par « antigène ou haptène spécifique d'un agent infectieux ou d'une cellule tumorale », on entend désigner en particulier tout composé exprimé par un agent infectieux, tel qu'un virus, une bactérie, une levure, un champignon ou un parasite, par une cellule tumorale, ou un de leurs analogues structuraux, qui seul ou en

association avec un adjuvant de l'immunité est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

Par analogue d'un antigène ou haptène, on entend désigner en particulier dans la présente description un composé présentant une analogie structurale avec ledit
5 antigène ou haptène capable d'induire une réponse immunologique dirigée contre ledit antigène ou haptène dans un organisme préalablement immunisé avec ledit composé analogue.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre, associé à ladite
10 protéine OmpA d'entérobactérie, un antigène ou un haptène spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit agent infectieux est une particule virale, une bactérie, une levure, un champignon ou un parasite.

15 Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

20 Les procédés d'extraction de protéines de membrane bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront pas développés dans la présente description. On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également
25 l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description,
30 on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut citer bien

entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in *E. coli*. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifère (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

De manière tout à fait préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés, de préférence 10, 15, 20 et 25 acides aminés, d'une séquence telle que définie en a).

Par séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés présentant une homologie d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés déterminée, on entend désigner une séquence qui après alignement optimal avec ladite séquence déterminée comprend un pourcentage d'identité d'au moins 80 % avec ladite séquence déterminée.

Par «pourcentage d'identité» entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur

toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par «fenêtre de comparaison» pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, «BLAST 2 sequences», disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres «open gap penalty» : 5, et «extension gap penalty» : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice «BLOSUM 62» proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

Parmi lesdites séquences présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence OmpA de référence, on préfère les séquences de, ou codant pour des,

peptides capables d'induire une activité CTL dirigée spécifiquement contre l'antigène ou haptène qui lui est associée, telle que l'activité CTL mesurée au moyen des techniques standards décrites dans les exemples ci-après.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est choisi parmi les protéines, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout composé capable de diriger spécifiquement la réponse CTL contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente, notamment par couplage chimique, avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter le couplage chimique, de préférence, ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit antigène ou haptène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit antigène ou haptène selon l'invention peuvent être réalisés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature dudit antigène ou haptène à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine

OmpA, ou l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique, lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique.

Les conjugués issus d'un couplage à ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine chimérique ou hybride (conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ledit antigène ou haptène de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185, 3-187, 1990).

Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride, ou comprend un vecteur contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride ou une cellule hôte transformée contenant ladite construction nucléique capable d'exprimer ladite protéine hybride.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à éliminer les agents infectieux ou à inhiber la croissance de tumeurs.

De préférence, l'utilisation selon l'invention est relative à la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les maladies infectieuses ou les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral.

Parmi les cancers dont les tumeurs expriment un antigène tumoral associé pouvant être prévenus ou traités par les utilisations selon la présente invention, on peut citer en particulier, mais sans s'y limiter :

- le cancer du sein, du poumon, du colon, et le carcinome gastrique (Kawashima et al., 1999, Cancer Res. 59:431-5) ;

- le mésothéliome, l'ostéosarcome, les cancers du cerveau (Xie et al., 1999, J. Natl. Cancer. Inst. 91:169-75) ;
- le mélanome (Zheuten et al., 1998, Bratisl. Lek. Listy 99:426-34) ;
- l'adénome cystique du pancréas (Hammel et al., 1998, Eur. J. gastroenterol. Hepatol. 10:345-8) ;
- le cancer colorectal (Ogura et al., 1998, Anticancer Res. 18:3669-75) ;
- le carcinome des cellules rénales (Jantzer et al., 1998, Cancer Res. 58:3078-86) ;
et
- le cancer de l'ovaire et du cervix (Sonoda et al., 1996, Cancer. 77:1501-9).

10 L'invention a en particulier pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse, notamment d'origine virale, bactérienne ou fongique, ou parasitaire, ou un cancer, de préférence associé à un antigène tumoral, en particulier les mélanomes.

15 L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment sous la forme d'un liposome.

20 De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit véhicule est un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride.

25 L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite construction nucléique, ou la construction nucléique contenue dans ledit vecteur ou ladite cellule hôte transformée, comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au moins 15 nucléotides, de préférence 20, 25, 30, 40 et 50 nucléotides consécutifs de la séquence
30 SEQ ID N° 1, ou une séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %, après alignement optimal avec l'une desdites séquences.

Sous un autre aspect, l'invention comprend une composition pharmaceutique telle que définie précédemment dans les utilisations selon la présente invention.

Parmi ces compositions, on préfère les compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent dans un milieu pharmaceutiquement acceptable au moins une protéine OmpA d'entérobactérie, ou un de ses fragments, associée par mélange ou par couplage à au moins un antigène ou un haptène associé ou spécifique d'une cellule tumorale.

Au sens de la présente invention, le milieu pharmaceutiquement acceptable est le milieu dans lequel les composés de l'invention sont administrés, préférentiellement un milieu injectable chez l'homme. Il peut être constitué d'eau, d'une solution aqueuse saline ou d'une solution aqueuse à base de dextrose et/ou de glycérol.

Dans un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention contient en outre un détergent.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir en outre un détergent, et notamment tout type de tensioactif pharmaceutiquement acceptable, comme par exemple des tensioactifs anioniques, cationiques, non-ioniques ou amphotères. On utilise préférentiellement les détergents Zwittergent 3-12 et l'octylglucopyranoside et encore plus préférentiellement le Zwittergent 3-14.

De préférence, la composition pharmaceutique selon l'invention est caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie ou par voie recombinante.

De préférence également, la composition pharmaceutique selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention concerne une composition selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou

c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés, de préférence 10, 15, 20 et 25 acides aminés, d'une séquence telle que définie en a).

Parmi les antigènes ou haptènes entrant dans la composition selon l'invention, on préfère ceux choisis parmi les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout composé capable de diriger spécifiquement une réponse CTL contre une cellule tumorale.

Dans un mode de réalisation également préféré, l'invention concerne une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, notamment par couplage réalisé par synthèse chimique et pour lequel, le cas échéant, un ou plusieurs éléments de liaison, tel un acide aminé, peut être introduit dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter ledit couplage chimique.

Dans un mode de réalisation également préféré, l'invention concerne une composition selon l'invention, caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique (expression d'une protéine hybride).

Ainsi, la présente invention concerne en outre une composition selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride, ladite construction nucléique pouvant être contenue dans un vecteur, ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine hybride.

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention concerne une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ladite construction nucléique comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1, ou une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec l'une desdites séquences.

Parmi les compositions selon l'invention, on préfère également les compositions pharmaceutiques véhiculées sous une forme permettant d'améliorer leur stabilité et/ou leur immunogénicité, notamment sous forme d'un liposome, d'un

vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride.

5 Sous un dernier aspect, la composition selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle ne contient aucun autre adjuvant permettant d'induire une réponse CTL, hormis ladite protéine OmpA d'enterobactérie, ou l'un de ses fragments, ou une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, élément caractéristique de la composition selon l'invention permettant d'induire une
10 réponse CTL.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

Figures 1A, 1B, 1C et 1D : Mesure de l'activité CTL anti-MELAN-A et anti-TRP-2
15 de cellules effectrices.

Après immunisation avec 50 μ g hELA mélangé avec 3 μ g rP40 (figure 1A), 50 μ g hELA mélangé avec 300 μ g rP40 (figure 1B), 50 μ g hELA couplé à rP40 (figure 1C), ou 50 μ g du peptide TRP-2 mélangé avec 300 μ g rP40 (figure 1D), les
20 cellules de ganglions drainants sont stimulées avec des cellules EL-4 A2/Kb (figures 1A, 1B, 1C) ou EL-4 (figure 1D) irradiées et pré-pulsées avec 1 μ M du peptide relevant avant d'être évaluées pour leur capacité à tuer des cellules cibles pré-pulsées (rectangle) ou non (losange) avec le peptide relevant.

Les abscisses des repères des figures 1A à 1D correspondent au rapport des
25 cellules T effectrices (lymphocytes activés) mises en présence sur les cellules cibles (EL-4 A2/Kb ou EL-4).

Figures 2A, 2B, 2C et 2D : Mesure de l'activité CTL anti-MELAN-A de cellules effectrices en présence de la protéine rP40 comparée à l'activité CTL obtenue avec un
protocole standard d'immunisation.

Après immunisation avec hELA (50 μ g) seul (ELA, Figure 2A), hELA mélangé
30 à 300 μ g rP40 (ELA + P40, figure 2B), hELA couplé à 300 μ g rP40 (ELA/P40, figure 2C) ou hELA mélangé avec 50 μ g de peptide P30 adjuvé avec IFA (ELA +

IFA + TT, figure 2D) (IFA pour Adjuvant Incomplet de Freund et TT pour Tetanus Toxoïd), les cellules de ganglions drainants sont stimulées deux semaines in vitro avec des cellules EL-4 A2/Kb irradiées et pré-pulsées avec 1 μ M du peptide relevant avant d'être évaluées pour leur capacité à tuer des cellules cibles EL-4 A2/Kb pré-pulsées (rectangle) ou non (losange) avec le peptide hELA.

Figures 3A, 3B, 3C et 3D : Activité CTL et effet antitumoral de l'immunisation avec rP40 + peptide TRP-2.

Figure 3A : L'immunisation avec un mélange du peptide TRP-2 avec rP40 induit une réponse CTL spécifique au peptide. Des souris C57BL/6 ont été injectées en s.c. avec 50 μ g du peptide TRP-2 mélangés avec 300 μ g de rP40. 10 jours plus tard, les ganglions ont été dissociés et restimulés avec des cellules EL-4 irradiées et pulsées (rectangles) ou non (losanges) avec le peptide TRP-2.

Figures 3B, 3C et 3D : Des souris C57BL/6 ont reçu 2 x 10³ cellules du mélanome autologue B16F10 en s.c. dans le flanc. Simultanément (figures 3B et 3D), ou 4 jours plus tard (figure 3C), certaines de ces souris ont été immunisées en s.c. (à la base de la queue) avec 50 μ g du peptide TRP-2 mélangés à 300 μ g de rP40 (o), d'autres ont été immunisées avec la protéine P40 seule (■, pour figures 3B et 3C) ou avec le peptide TRP-2 seul (■, pour figure 3D). A partir du 18ème jour post-implantation, le volume des tumeurs a été mesuré.

Figures 4A, 4B, et 4C : Mesure de l'activité CTL anti-OVA après immunisation par la protéine rP40 couplée au peptide OVA p257-264.

Des souris C57BL/6 ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue 200 μ g de P40-Ova (■), de billes couplées à l'Ova (○), d'Ova solubilisée (□), d'Ova-BS³ (▲) (BS³ pour Bis (succinimidyl) Subérate), de P40 (<), ou de DT-Ova (●) (DT pour Diphtérique Toxoïd).

Les cellules cibles thymomes EL4 pulsées avec 50 μ g /ml de peptide OVA (figure 4B) ou non (figure 4C) ou transfectées avec le gène *ova* (lignée E.G7) (figure 4A) sont incubées avec du ⁵¹Cr à 37°C et cultivées avec les cellules effectrices.

Exemple 1 : Clonage du gène codant pour la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*

Le gène codant pour la protéine P40 a été obtenu par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP I145 (Nguyen et col., Gene, 1998). Le fragment de gène codant de ce gène est inséré dans divers vecteurs d'expression sous contrôle de différents promoteurs, en particulier celui de l'opéron Trp. La séquence nucléotidique et la séquence peptidique de la protéine P40 sont représentées par les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 ci-après. Une souche productrice *E. coli* K12, a été transformée par un vecteur d'expression pvaLP40. La protéine recombinante P40 (dénommée rP40) est produite sous forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 % en g de protéine/g de biomasse sèche).

Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la protéine rP40, celle-ci pouvant être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi qu'à d'autres vecteurs d'expression.

Exemple 2 : Procédé de fermentation de protéines de fusion rP40

Dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma) on inocule avec la souche *E. coli* transformée décrite ci-dessus. On incube pendant une nuit à 37°C puis, 200 ml de cette culture sont utilisés pour ensemer 2 litres de milieu de culture dans un fermenteur (Biolafitte, France). De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour favoriser une croissance de cellules bactériennes à densité élevée.

Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (glycérol ou glucose). De manière générale, le pH est régulé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après

induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 g.

Exemple 3 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

Extraction de la rP40

5 Après centrifugation du bouillon de culture (4000 rpm (tours par minute), 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5. Les insolubles, ou corps d'inclusion, sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure à température ambiante sous agitation douce). Le culot
10 de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl, 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl₂ puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

On solubilise les corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM de dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000g)
15 permet d'éliminer les particules non solubles.

On resuspend ensuite dans 13 X volumes de tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (favoriser la renaturation de la protéine par dilution et réoxydation des ponts
20 disulfures).

Purification de la protéine rP40

- Etape de chromatographie d'échange d'anions.

Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl, 25 mM, pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 X volumes de
25 tampon) pendant une nuit à 4°C.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prop High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus, à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de
30 0,2 M en NaCl dans le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,5 : 0,1 % Zwittergent 3-14.

- Etape de chromatographie d'échange de cations.

Les fractions contenant la protéine rP40 sont poolées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan
5 Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate
10 20 mM, pH 3,0, à 0,1% de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95 %. L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme dénaturée ou native, la protéine P40, extraite de la membrane de *Klebsiella pneumoniae*, possède un comportement électrophorétique
15 (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuillets β) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices α) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine, ou par chauffage à 100°C en présence de SDS. La protéine rP40 n'est pas correctement renaturée en fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence
20 de 0,1 % ; (p/v) Zwittergent 3-14. En revanche, une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) Zwittergent 3-14. Toutefois, il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que, lorsque l'étape de dilution et le traitement à température ambiante, sont réalisés eux-mêmes en présence de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

25 Exemple 4 : Génération de CTL

Les réponses CTL antitumorales dirigées contre les cellules de mélanome ont été définies pour plusieurs antigènes. Ces antigènes sont compris dans l'une de trois catégories :

- a) les antigènes de rejet spécifiques du mélanome, tels que ceux de la famille
30 des MAGE (revu par van der Bruggen et al., Science 254 :1643) ;

b) les antigènes résultant de la mutation de protéines normales. Ce groupe inclut MUM-1 (Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980 (1995) ; CDK4 (Wolfel et al., Science 296:1281-1284 (1995) et HLA-A2 (Brandel et al., J. Exp. Med. 183:2501-2508 (1996) ;

5 c) les antigènes de différenciation, exprimés par les mélanomes et les mélanocytes. Ce groupe inclut la tyrosinase (Wolfel et al., Eur J. Immunol. 4:759 (1994) et Brichard et al., Eur. J. Immunol. 26:224 (1996)) ; gp 100 (Kang et al., J. Immunol. 155:1343 (1995), Cox et al., Science 264:716 (1994), et Kawakami et al., J. Immunol. 155:3961 (1995)) ; gp75 (Wang et al., J. Exp. Med. 183:1131 (1996)),
10 et Mart-1/MelanA (voir brevet US 5,620,886).

De tous ces antigènes, Mart-1/MelanA apparaît comme le meilleur candidat dans une utilisation en immunothérapie, et ce pour plusieurs raisons. D'abord, cet antigène a été identifié à partir de la réponse CTL in vivo des lymphocytes infiltrant le mélanome et non celle, in vitro, des cellules du sang périphérique, ce qui suggérerait
15 une plus grande pertinence de cet antigène dans la réponse naturelle in vivo contre le mélanome (Kawakami et al., J. Exp. Med. 180:347 (1994)). De plus, Mart-1/MelanA est exprimé sur tous les mélanomes examinés, ce qui en fait une cible privilégiée d'une intervention immunothérapique. Enfin, des peptides dérivés de Mart-1/MelanA sont capables d'induire une réponse CTL spécifique chez les patients du mélanome
20 exprimant l'antigène d'histocompatibilité HLA-A2 (Rivoltini et al., J. Immunol. 154:2257 (1995) ; Valmori et al. J. Immunol. 160:1750 (1998)).

HLA-A2 est l'allèle le plus fréquemment exprimé chez les Caucasiens. Les épitopes CTL de Mart-1/MelanA ont été définis pour cet allèle. Le peptide antigénique reconnu par la majorité des lignées CTL humaines comprend les acides
25 aminés 27-35 AAGIGILTV (Kawakami et al., J. Exp. Med. 180:347 (1994)). D'autre part, des études sur l'affinité de la liaison avec HLA-A*0201 et la reconnaissance par des clones CTL ont démontré que le peptide optimal pour ces deux fonctions est le décapeptide 26-35 EAAGIGILTV (Romero et al, J. Immunol. 159:2366 (1997)). Cependant, il apparaît que ces peptides sont faiblement immunogéniques in vitro
30 (Valmori et al. J. Immunol. 160:1750 (1998)) et in vivo (Jaeger et al., Int. J. Cancer 66:162 (1996)).

En comparant la séquence des acides aminés des épitopes T de Mart-1/MelanA avec les motifs peptidiques de A*0201 (Rammensee et al., Immunogenetics 41:178 (1995)), il apparaît que les peptides 26-35 et 27-35 ont des résidus d'ancrage non dominants à la position 2 et lient donc faiblement la molécule HLA-A*0201 (Kawakami et al., J. Immunol. 154:3961 (1995)), ce qui pourrait expliquer leur faible immunogénicité. La demande internationale de brevet publiée sous le numéro WO 98/58951 décrit un analogue au peptide 26-35 où l'Alanine en position 2 a été remplacée par une Leucine (séquence que l'on appellera ELA de séquence SEQ ID N° 3).

Le peptide hELA, utilisé dans les expériences ci-dessous, est l'objet de la demande de brevet WO 98/58951 propriété de l'Institut Ludwig de Recherche sur le Cancer. hELA est un analogue du décapeptide 26-35 (EAAGIGILTV) de Melan-A/MART-1, une protéine exprimée sur les mélanocytes et les mélanomes. Bien que le décapeptide 26-35 de Melan-A/MART-1 soit capable de se lier à la molécule HLA-A0201 (Romero et al., 1997, J. Immunol., 159, 2366-2374), il est faiblement immunogène in vitro et in vivo (Valmori et al., 1998, J. Immunol., 160, 1750-1758). L'analogue hELA a été généré par la substitution du second acide aminé du décapeptide 26-35 de Melan-A/MART-1 (une alanine) par une leucine. Le résultat de cette substitution, qui est basée sur une analyse des résidus nécessaire à l'ancrage des peptides à la molécule HLA-A0201, est une reconnaissance plus efficace par les CTL de patients de mélanome et une meilleure immunogénicité in vitro (Valmori et al., 1998, J. Immunol. 160, 1750-1758). Des souris transgéniques HLA-A* 0201/Kb (A2/Kb) de souche C57Bl/6 x BDA/2 (Vitiello et al., 1991, J. Exp. Med., 173, 1007-1015) ont été utilisées dans cette étude pour tester ELA. La molécule MHC de classe I exprimée chez ces souris est une molécule chimérique formée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule humaine HLA-A0201 (allotype le plus fréquemment retrouvé) et du domaine $\alpha 3$ de la molécule murine K^b.

Le peptide TRP-2 de séquence SEQ ID N° 4 est un octapeptide correspondant aux acides aminés 181-188 (VYDFFVWL) de la tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). TRP-2 est exprimé dans les mélanocytes et les mélanomes. Il a été démontré que cet

antigène induit des réponses CTL protectrices du mélanome dans les souris C57BL/6 (H-2K^b) (Bloom et al., 1997, J. Exp. Med. 185, 453-459).

A : Génération de CTL anti-Melan-A et anti-TRP-2 après immunisation par rP40 mélangé à un peptide analogue au Melan-A ou TRP-2

5 Protocole expérimental

Des souris A2/Kb ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue :

- 50 µg ELA mélangés à 3 ou 300 µg rP40 ;
- 50 µg ELA couplés de façon covalente à 300 µg rP40.

Des souris C57BL/6 ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue :

- 10 - 50 µg du peptide TRP-2 (181-188) mélangés à 300 µg rP40.

Génération de cellules cytotoxiques effectrices

10 jours après immunisation, les souris sont sacrifiées et les lymphocytes des ganglions drainants sont récupérés pour être stimulés in vitro avec le peptide relevant.

- 15 Ces lymphocytes (4 à 5 10⁶) sont cultivés en plaque 24 puits en DMEM plus 10 mM HEPES, 10 % SVF et 50 µM β-2-mercaptoéthanol avec 2 à 5 10⁵ cellules EL-4 A2/Kb ou EL4 irradiées (10 kRads) pré-pulsées 1 h à 37°C avec 1 µM du peptide relevant. Après deux stimulations hebdomadaires, les cellules sont testées pour leur activité cytotoxique.

Mesure de l'activité cytotoxique

- 20 Les cellules EL-4 A2/Kb ou EL4 sont incubées 1 h avec du ⁵¹Cr en présence ou non du peptide relevant, lavées puis co-incubées avec les cellules effectrices à différents ratio en plaque 96 puits dans un volume de 200 µl pendant 4 à 6h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et le relargage de ⁵¹Cr est mesuré dans 100 µl de surnageant. Le pourcentage de lyse spécifique est calculé comme suit :

- 25 % lyse spécifique = (relargage expérimental-relargage spontané) / (relargage total - relargage spontané) X 100.

Résultats

- 30 Comme le montrent les figures 1A à 1D, l'immunisation de souris avec une dose optimale de rP40 (300 µg) en mélange avec hELA (figure 1B) ou TRP-2 (figure 1D) induit une forte réponse CTL spécifique. Une telle réponse est également observée après immunisation avec rP40 couplée à hELA (figure 1C). Par contre,

l'immunisation avec le peptide seul ou rP40 seule (résultats non montrés) ou avec le peptide hELA en mélange avec une dose sous-optimale de rP40 ($3 \mu\text{g}$) n'induit aucune activité CTL (figure 1A). Ces résultats démontrent que la molécule rP40 mélangée ou couplée à des peptides immunogènes permet d'induire une réponse CTL spécifique in vivo, et ce sans l'ajout d'adjuvant.

B : Génération de CTL anti-Melan-A après immunisation par rP40 mélangé à un peptide analogue au Melan-A comparée à un protocole standard d'immunisation

Protocole experimental

Des souris A2/Kb ont reçu :

- $50 \mu\text{l}$ d'IFA (adjuvant incomplet de Freud) en injection sous-cutanée à la base de la queue puis 3 semaines après $50 \mu\text{g}$ de hELA en présence de $50 \mu\text{g}$ d'un peptide p30 T helper dérivé de tétanus toxoid (TT) (Panina-Bordignon et al., Eur. J. Immunol., 1989, 19, 2237) adjuvé en IFA. Ce protocole a été décrit pour permettre de générer des CTL anti-peptide (Valmori et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1458) et sert de contrôle positif.
- $50 \mu\text{g}$ de hELA seul ou $300 \mu\text{g}$ de rP40 mélangé ou couplé à $50 \mu\text{g}$ hELA

Génération de cellules cytotoxiques effectrices

10 jours après la dernière immunisation, les souris sont sacrifiées et les lymphocytes des ganglions drainants sont récupérés pour être stimulés in vitro avec le peptide relevant.

Ces lymphocytes ($4 \text{ à } 5 \cdot 10^6$) sont cultivés en plaque 24 puits en DMEM plus 10 mM HEPES, 10% SVF et $50 \mu\text{M}$ β -2-mercaptoethanol avec $2 \text{ à } 5 \cdot 10^5$ cellules EL-4 A2/Kb (cellules murines transfectées avec le gène HLA-A* 0201/Kb) irradiées (10 kRads) pré-pulsées 1 h à 37°C avec $1 \mu\text{M}$ du peptide relevant.

Après une, deux ou trois stimulations hebdomadaires, les cellules sont testées pour leur activité cytotoxique.

La mesure de l'activité cytotoxique est effectuée selon la méthode décrite précédemment.

Résultats

Une activité CTL anti-hELA est mesurée après immunisation par rP40 couplée à hELA non adjuvé comparable à celle observée après immunisation avec hELA + P30/IFA (cf. figures 2C et 2D). De même, le mélange rP40 + peptide hELA lui aussi
5 non adjuvé génère des CTL de manière similaire à ce qui est obtenu avec un protocole classique de génération de CTL (cf. figures 2B et 2D).

Aucune activité CTL n'a été détectée après immunisation avec le peptide seul (cf. figure 2A), ou la protéine rP40 seule (non montrée) indépendamment du jour de stimulation des cellules effectrices.

10 Exemple 5 : Effet antitumoral de l'immunisation par un mélange de rP40 et d'un peptide exprimé par un mélanome de souris

Pour évaluer la capacité de rP40 à générer une réponse CTL antitumorale, la capacité de la protéine rP40 à induire une réponse CTL dirigée contre le peptide de séquence SEQ ID No. 4 (VYDFFVWL) a été testée. Le peptide de séquence SEQ ID
15 N° 4 (VYDFFVWL) est dérivé de la protéine Tyrosinase Related Protein 2 (TRP-2) qui est exprimée par le mélanome B16F10 issu de la souris C57BL/6. Ce peptide est immunogène dans cette souche. La croissance des cellules B16F10 implantées dans des souris C57BL/6 qui ont été immunisées ou pas avec un mélange de rP40 et du peptide TRP-2 a été ensuite testée.

20 Protocole expérimental

Pour la génération d'une réponse CTL anti-peptide TRP-2, un protocole identique à celui décrit dans l'exemple 4 a été utilisé, sauf qu'ici des souris C57BL/6 ont été utilisées.

Pour les expériences de protection, des souris C57BL/6 ont reçu 2×10^3
25 cellules du mélanome autologue B16F10 en injection sous-cutanée (s.c.) dans le flanc. Simultanément, ou 4 jours plus tard, certaines de ces souris ont été immunisées en s.c. (à la base de la queue) avec 50 μ g du peptide TRP-2 mélangés à 300 μ g de rP40. La croissance de la tumeur a ensuite été mesurée à intervalles réguliers.

Résultats

30 Comme le montre la figure 3A, l'immunisation avec un mélange de peptide TRP-2 et de la protéine RP40 est capable de générer une réponse CTL spécifique à ce

peptide, ce qui confirme les résultats obtenus avec la peptide hELA (décrits dans l'exemple 4). De plus, cette réponse CTL est associée à une inhibition de la croissance du mélanome B16F10 (figures 3B, 3C et 3D). Il est intéressant de noter que cette protection est significative non seulement quand l'immunisation avec le peptide TRP-2 + rP40 est faite simultanément avec l'implantation de la tumeur (figures 3B et 3D), mais aussi 4 jours l'implantation (figure 3C).

Ces résultats montrent clairement l'effet thérapeutique de l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, telle que la protéine OmpA de *K. pneumoniae* associée à un peptide tumoral antigénique pour induire une réponse spécifique de type CTL efficace pour la prévention ou le traitement de cancer, tel que les mélanomes.

Exemple 6 : Génération de CTL anti-OVA après immunisation par rP40 couplée au peptide Ova p257-264

Le peptide Ova p257-264 est un octapeptide correspondant au fragment de la séquence consensus de l'ovalbumine compris entre les acides aminés en position 257 à 264 de la séquence de l'ovalbumine (extrémités comprises). L'ovalbumine est utilisé comme un peptide protecteur vis-à-vis de cellules tumorales exprimant l'ovalbumine.

Protocole expérimental

Des souris C57BL/6 ont reçu par injection sous-cutanée à la base de la queue 200 µg de P40-Ova (■), de billes couplées à l'Ova (○), d'Ova solubilisée (□), d'Ova-BS³ (▲) (BS³ pour Bis (succinimidyl) Subérate), de P40 (◁), ou de DT-Ova () (DT pour Diphtérique Toxoïd).

Génération de cellules cytotoxiques effectrices

7 jours après immunisation, les souris sont sacrifiées et les rates sont récupérées. Les cellules de rate ($4 \cdot 10^7$) sont cultivées en flasque en DMEM avec $1,5 \cdot 10^6$ de cellules E.G7 irradiées (4kRads).

Mesure de l'activité cytotoxique

Les cellules thymomes EL4 pulsées ou non avec le peptide OVA ou transfectées avec le gène *ova* (lignée E.G7) sont incubées avec du ⁵¹Cr à 37°C et cultivées avec les cellules effectrices obtenues ci-dessus.

Le pourcentage de lyse spécifique est calculé comme décrit à l'exemple 4A.

Résultats

Comme le montrent les figures 4A à 4C, l'immunisation de souris avec la protéine rP40 couplée ou en mélange avec le peptide OVA induit une forte réponse CTL spécifique. Cette réponse est similaire à celle observée après immunisation avec le témoin positif, à savoir les billes couplées à l'ovalbumine (voir figures 4A et 4B). Par contre, l'immunisation avec l'ovalbumine soluble, ova-BS³ et DT-Ova n'est pas efficace. Ces résultats démontrent que la molécule rP40 couplée à un peptide immunogène permet d'induire une réponse CTL spécifique in vivo, et ce sans l'ajout d'adjuvant.

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à générer ou accroître une réponse T cytotoxique contre un agent infectieux ou une cellule tumorale.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre, associé à ladite protéine OmpA d'entérobactérie, un antigène ou un haptène spécifique dudit agent infectieux ou de ladite cellule tumorale.

3/ Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ledit agent infectieux est une particule virale, une bactérie ou un parasite.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

6/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

7/ Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a).

8/ Utilisation selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est choisi parmi les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout

composé capable de diriger spécifiquement la réponse CTL contre ledit agent infectieux ou ladite cellule tumorale.

9/ Utilisation selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage réalisé par synthèse chimique.

12/ Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter le couplage chimique.

13/ Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

14/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique.

15/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride.

16/ Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que ladite construction nucléique est contenue dans un vecteur, ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine hybride.

17/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à éliminer les agents infectieux ou à inhiber la croissance de tumeurs.

- 18/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les maladies infectieuses comprenant les infections virales, bactériennes, fongiques et parasitaires.
- 5 19/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers.
- 20/ Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers associés à un antigène tumoral.
- 10 21/ Utilisation selon les revendications 19 et 20, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir les mélanomes.
- 22/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.
- 15 23/ Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit véhicule est un liposome, un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride.
- 20 24/ Utilisation selon l'une des revendications 15, 16 et 23, caractérisée en ce que ladite construction nucléique ou la construction nucléique contenue dans ledit vecteur ou ladite cellule hôte transformée, comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1, ou une séquence présentant une
- 25 homologie d'au moins 80 % avec l'une desdites séquences.
- 25/ Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend dans un milieu pharmaceutiquement acceptable au moins une protéine OmpA d'entérobactérie, ou un de ses fragments, associée par mélange ou par couplage à au moins un antigène ou un haptène associé ou spécifique d'une cellule tumorale.

26/ Composition selon la revendication 25, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

27/ Composition selon la revendication 25, caractérisée en ce que ladite
5 protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

28/ Composition selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

29/ Composition selon la revendication 28, caractérisée en ce que la
10 séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins
80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- 15 c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a).

30/ Composition selon l'une des revendications 25 à 29, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est choisi parmi les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides ou tout
20 composé capable de diriger spécifiquement une réponse CTL contre ladite cellule tumorale.

31/ Composition selon l'une des revendications 25 à 30, caractérisée en ce que ledit antigène ou haptène est couplé par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

25 32/ Composition selon la revendication 31, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage réalisé par synthèse chimique.

33/ Composition selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit antigène ou haptène pour faciliter le couplage
30 chimique.

34/ Composition selon la revendication 33, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

35/ Composition selon la revendication 31, caractérisée en ce que le couplage entre ledit antigène ou haptène et ladite protéine OmpA, où l'un de ses fragments, est réalisé par recombinaison génétique lorsque ledit antigène ou haptène est de nature peptidique.

36/ Composition selon la revendication 35, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour la protéine hybride obtenue après ledit couplage.

37/ Composition selon la revendication 36, caractérisée en ce que ladite construction nucléique est contenue dans un vecteur, ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine hybride.

38/ Composition selon l'une des revendications 36 et 37, caractérisée en ce que ladite construction nucléique comprend une séquence nucléique choisie parmi la séquence SEQ ID N° 1, l'un de ses fragments présentant au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1, ou une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 1.

39/ Composition selon l'une des revendications 25 à 38, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

40/ Composition selon la revendication 39, caractérisée en ce que ledit véhicule est un liposome, un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit antigène ou haptène, ou ladite protéine hybride.

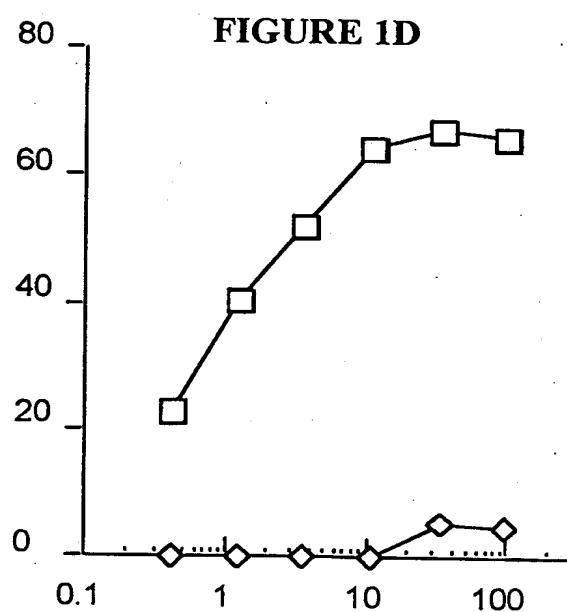
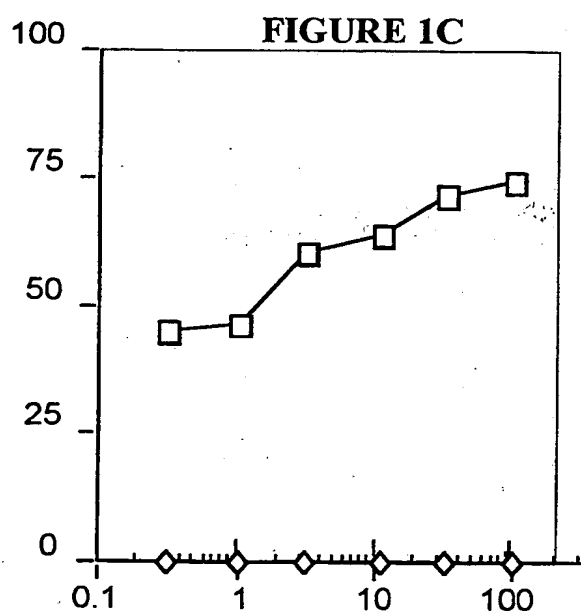
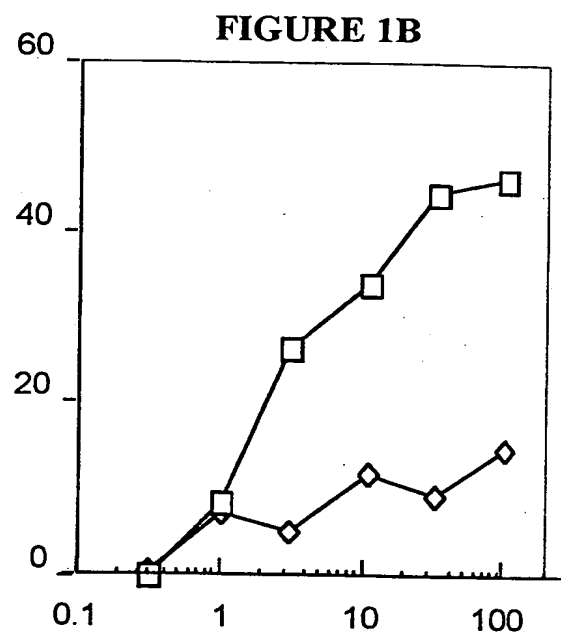
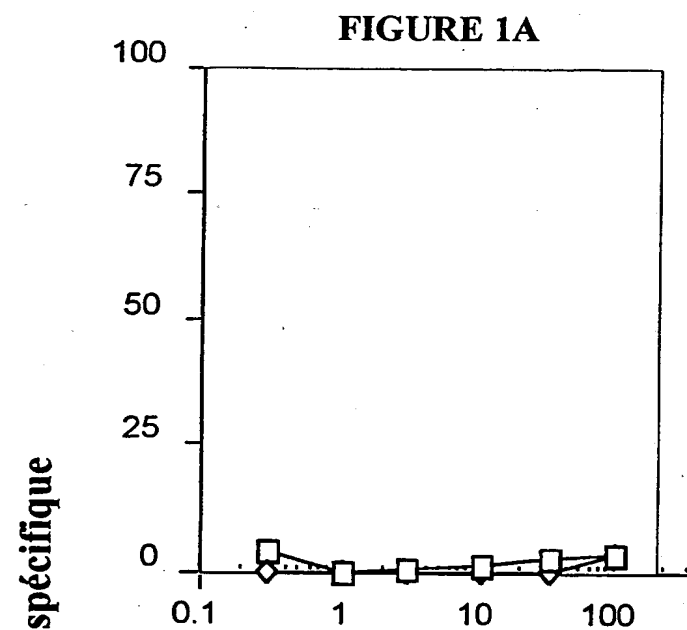
41/ Composition selon l'une des revendications 25 à 40, caractérisée en ce que ledit milieu pharmaceutiquement acceptable est constitué d'eau, d'une solution aqueuse saline ou d'une solution aqueuse à base de dextrose et/ou de glycérol.

42/ Composition selon l'une des revendications 25 à 41, caractérisée en ce que ladite composition contient en outre un détergent.

43/ Composition selon l'une des revendications 25 à 42, sans autre adjuvant permettant d'induire une réponse CTL.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/4



Rapport cellules effectrices sur cellules cibles

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/4

FIGURE 2A

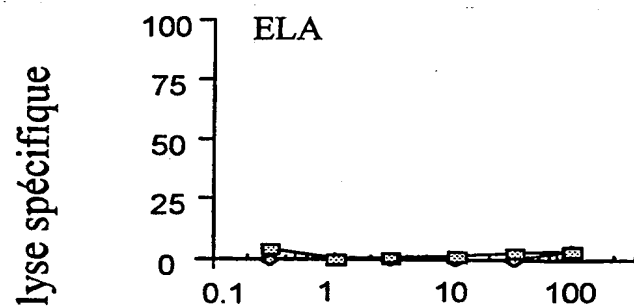


FIGURE 2B

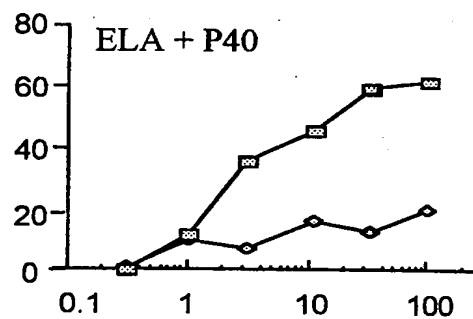


FIGURE 2C

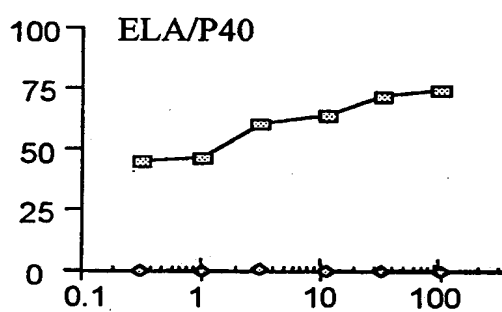
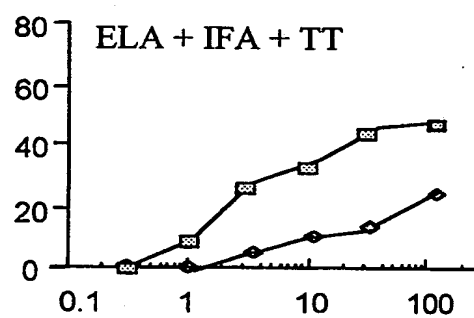


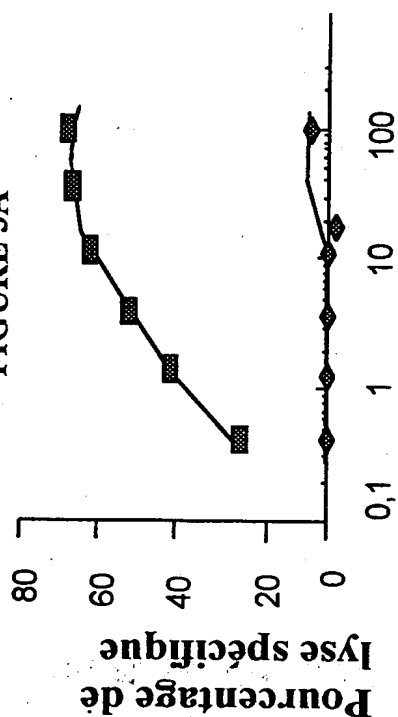
FIGURE 2D



Rapport cellules effectrices sur cellules cibles

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGURE 3A



Rapport cellules effectrices sur cellules cibles

FIGURE 3B

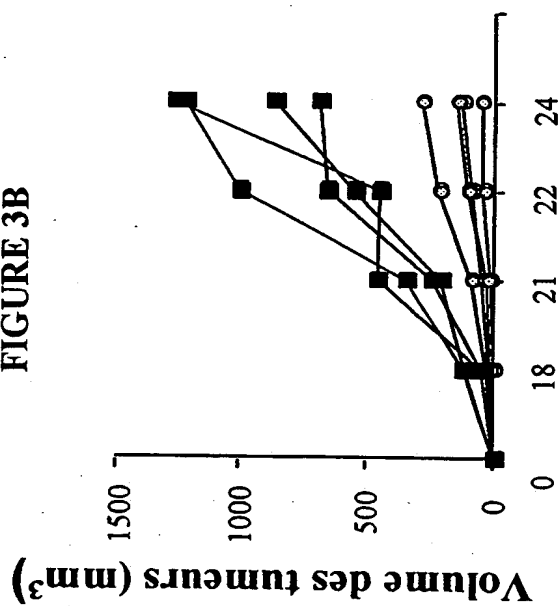


FIGURE 3C

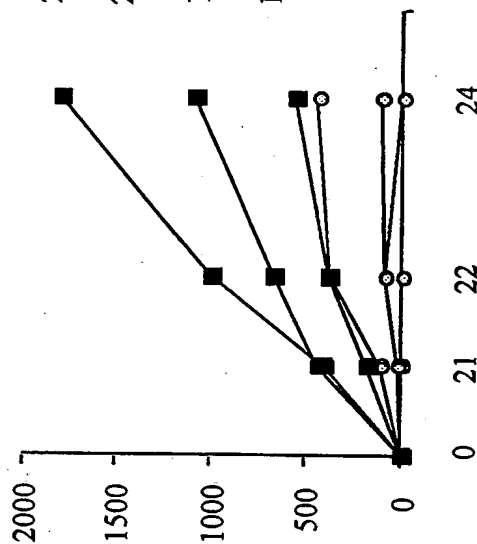
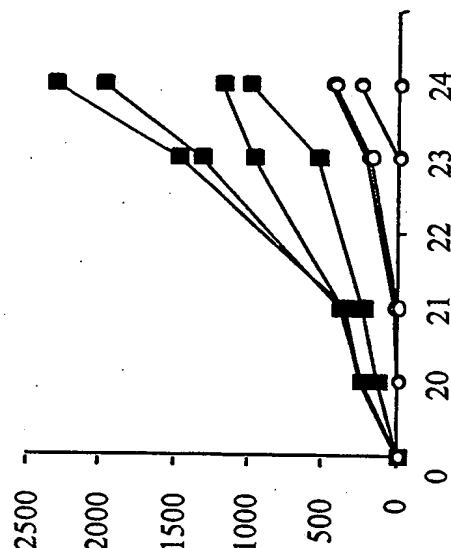


FIGURE 3D



Nombre de jours après implantation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pourcentage de lyse spécifique

FIGURE 4A

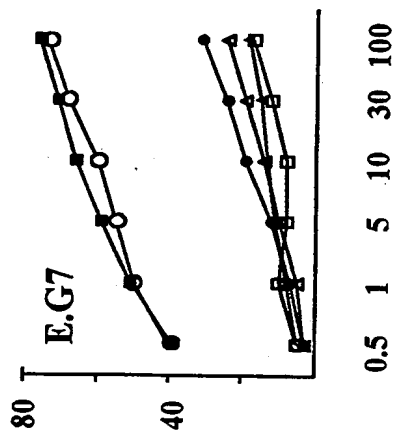


FIGURE 4B

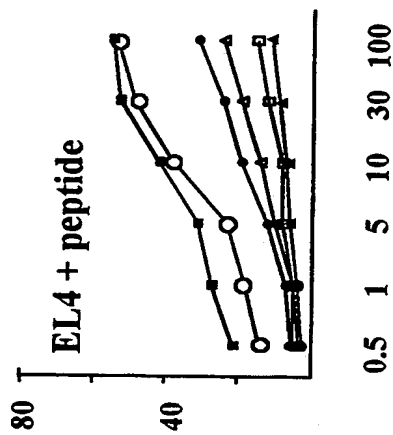
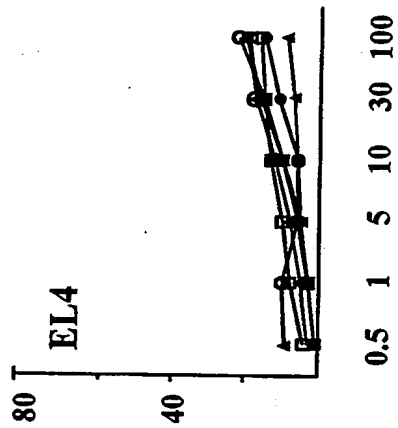


FIGURE 4C



Rapport cellules effectrices sur cellules cibles

THIS PAGE BLANK (USPTO)

LISTE DE SEQUENCES

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE
ASSOCIEE A UN ANTIGENE POUR GENERER UNE REPONSE CYTOTOXIQUE ANTIVIRALE,
ANTIPARASITAIRE OU ANTITUMORALE

<130> D17921

<150> FR 99 01917

<151> 1999-02-17

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1035

<212> ADN

<213> Klebsiella pneumoniae

<220>

<221> exon

<222> (1)..(1032)

<220>

<221> intron

<222> (1033)..(1035)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

<400> 1

atg	aaa	gca	att	ttc	gta	ctg	aat	gcg	gct	ccg	aaa	gat	aac	acc	tgg	48
Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	
1				5				10					15			
tat	gca	ggt	ggt	aaa	ctg	ggt	tgg	tcc	cag	tat	cac	gac	acc	ggt	ttc	96
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
		20					25						30			
tac	ggt	aac	ggt	ttc	cag	aac	aac	aac	ggt	ccg	acc	cgt	aac	gat	cag	144
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
		35				40						45				
ctt	ggt	gct	ggt	gcg	ttc	ggt	ggt	tac	cag	gtt	aac	ccg	tac	ctc	ggt	192
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
	50					55					60					
ttc	gaa	atg	ggt	tat	gac	tgg	ctg	ggc	cgt	atg	gca	tat	aaa	ggc	agc	240
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65				70				75					80		
gtt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	gtt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
			85					90					95			
ctg	ggt	tac	ccg	atc	act	gac	gat	ctg	gac	atc	tac	acc	cgt	ctg	ggc	336
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	

THIS PAGE BLANK (USP-10)

100	105	110	
ggc atg gtt tgg cgc gct gac tcc aaa ggc aac tac gct tct acc ggc Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly 115 120 125			384
ggt tcc cgt agc gaa cac gac act ggc gtt tcc cca gta ttt gct ggc Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly 130 135 140			432
ggc gta gag tgg gct gtt act cgt gac atc gct acc cgt ctg gaa tac Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr 145 150 155 160			480
cag tgg gtt aac aac atc ggc gac gcg ggc act gtg ggt acc cgt cct Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro 165 170 175			528
gat aac ggc atg ctg agc ctg ggc gtt tcc tac cgc ttc ggt cag gaa Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu 180 185 190			576
gat gct gca ccg gtt gtt gct ccg gct ccg gct ccg gct ccg gaa gtg Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val 195 200 205			624
gct acc aag cac ttc acc ctg aag tct gac gtt ctg ttc aac ttc aac Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn 210 215 220			672
aaa gct acc ctg aaa ccg gaa ggt cag cag gct ctg gat cag ctg tac Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr 225 230 235 240			720
act cag ctg agc aac atg gat ccg aaa gac ggt tcc gct gtt gtt ctg Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu 245 250 255			768
ggc tac acc gac cgc atc ggt tcc gaa gct tac aac cag cag ctg tct Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser 260 265 270			816
gag aaa cgt gct cag tcc gtt gtt gac tac ctg gtt gct aaa ggc atc Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile 275 280 285			864
ccg gct ggc aaa atc tcc gct cgc ggc atg ggt gaa tcc aac ccg gtt Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val 290 295 300			912
act ggc aac acc tgt gac aac gtg aaa gct cgc gct gcc ctg atc gat Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp 305 310 315 320			960
tgc ctg gct ccg gat cgt cgt gta gag atc gaa gtt aaa ggc tac aaa Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys 325 330 335			1008
gaa gtt gta act cag ccg gcg ggt taa Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly 340			1035

THIS PAGE BLANK (1987)

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 2

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp
 1 5 10 15

Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
 20 25 30

Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
 35 40 45

Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
 50 55 60

Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser
 65 70 75 80

Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys
 85 90 95

Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly
 100 105 110

Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly
 115 120 125

Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140

Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr
 145 150 155 160

Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro
 165 170 175

Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu
 180 185 190

Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val
 195 200 205

Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn
 210 215 220

Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu
 245 250 255

Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser
 260 265 270

Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
290 295 300

Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
305 310 315 320

Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
325 330 335

Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
340

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Peptide dérivé de l'antigène Mart-1/MelanA exprimé
par les cellules de mélanome.

<400> 3

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Dérivé de la tyrosinase-related protein 2 (TRP-2).

<400> 4

Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00393

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00
A61K39/385 //C07K14/26,C12N15/62

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données; et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HAEUW JF ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 446-454, XP002114947 * page 450, colonne de gauche, ligne 26 - colonne de droite, ligne 21 * page 452, colonne de droite, ligne 18 - ligne 50	1-43
A	RAULY I ET AL: "P40: A promising new carrier protein." RESEARCH IN IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 1, janvier 1998 (1998-01), page 99 XP002116543 abrégé	1-43

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

man. internationale No

PCT/FR 00/00393

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALURKAR V ET AL: "Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 6, juin 1997 (1997-06), pages 2382-8, XP002120290 page 2386, colonne de droite, ligne 26 -page 2387, colonne de gauche, ligne 48	1-43
A	FR 2 748 476 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 14 novembre 1997 (1997-11-14) revendications 1,3,9,10,14,18	1-43
A	FR 2 726 472 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 10 mai 1996 (1996-05-10) page 16, ligne 5 -page 17, ligne 13; revendications 1-18	1-43
P,X	KIM S K ET AL: "Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis in human genital tract infections." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, no. 11, 1 juin 1999 (1999-06-01), pages 6855-66, XP002120614 abrégé	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Derivé internationale No

PCT/FR 00/00393

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2748476 A	14-11-1997	AU 2901997 A	26-11-1997
		BR 9708979 A	03-08-1999
		CA 2254084 A	13-11-1997
		CN 1221348 A	30-06-1999
		EP 0914152 A	12-05-1999
		WO 9741888 A	13-11-1997
FR 2726472 A	10-05-1996	AU 714423 B	06-01-2000
		AU 4119996 A	31-05-1996
		CA 2204510 A	17-05-1996
		EP 0791063 A	27-08-1997
		WO 9614415 A	17-05-1996
		JP 10508595 T	25-08-1998
		ZA 9509416 A	06-06-1996

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat I Application No
PCT/FR 00/00393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00
A61K39/385 //C07K14/26, C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAEUW JF ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 446-454, XP002114947 * page 450, left-hand column, line 26 - right-hand column, line 21 * page 452, right-hand column, line 18 - line 50	1-43
A	RAULY I ET AL: "P40: A promising new carrier protein." RESEARCH IN IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 1, January 1998 (1998-01), page 99 XP002116543 abstract	1-43

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 2000

Date of mailing of the international search report

09/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/FR 00/00393

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALURKAR V ET AL: "Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 2382-8, XP002120290 page 2386, right-hand column, line 26 -page 2387, left-hand column, line 48	1-43
A	FR 2 748 476 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 14 November 1997 (1997-11-14) claims 1,3,9,10,14,18	1-43
A	FR 2 726 472 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 10 May 1996 (1996-05-10) page 16, line 5 -page 17, line 13; claims 1-18	1-43
P, X	KIM S K ET AL: "Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis in human genital tract infections." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, no. 11, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 6855-66, XP002120614 abstract	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00393

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2748476	A	14-11-1997	AU 2901997	26-11-1997
			BR 9708979	03-08-1999
			CA 2254084	13-11-1997
			CN 1221348	30-06-1999
			EP 0914152	12-05-1999
			WO 9741888	13-11-1997
FR 2726472	A	10-05-1996	AU 714423	06-01-2000
			AU 4119996	31-05-1996
			CA 2204510	17-05-1996
			EP 0791063	27-08-1997
			WO 9614415	17-05-1996
			JP 10508595	25-08-1998
			ZA 9509416	06-06-1996

THIS PAGE BLANK (USPTO)